

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】 日本国特許庁 (JP)	(19)[ISSUING COUNTRY] Japan Patent Office (JP)
(12)【公報種別】 公開特許公報 (A)	(12)[GAZETTE CATEGORY] Laid-open Kokai Patent (A)
(11)【公開番号】 特開平10-17488	(11)[KOKAI NUMBER] Unexamined Japanese Patent Heisei 10-17488
(43)【公開日】 平成10年 (1998) 1月 20日	(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION] January 20, Heisei 10 (1998. 1.20)
(54)【発明の名称】 緑内障治療薬	(54)[TITLE of the Invention] GLAUCOMA THERAPEUTIC AGENT
(51)【国際特許分類第6版】 A61K 38/00 ABL AED // C07K 5/08 ZNA 7/64 14/78	(51)[IPC Int. Cl. 6] A61K 38/00 ABL AED // C07K 5/08 ZNA 7/64 14/78
【FI】 A61K 37/02 ABL C07K 5/08 ZNA 7/64 14/78 A61K 37/02 AED	【FI】 A61K 37/02 ABL C07K 5/08 ZNA 7/64 14/78 A61K 37/02 AED
【審査請求】 未請求	[REQUEST FOR EXAMINATION] No
【請求項の数】 5	[NUMBER OF CLAIMS] 5

【出願形態】 OL

[FORM of APPLICATION] Electronic

【全頁数】 6

[NUMBER OF PAGES] 6

(21)【出願番号】

特願平8-164849

(21)[APPLICATION NUMBER]

Japanese Patent Application Heisei 8-164849

(22)【出願日】

平成8年(1996)6月25日

(22)[DATE OF FILING]

June 25, Heisei 8 (1996. 6.25)

(71)【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

000000044

[ID CODE]

000000044

【氏名又は名称】

旭硝子株式会社

[NAME OR APPELLATION]

Asahi Glass Co., Ltd.

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内2丁目1
番2号

[ADDRESS or DOMICILE]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

塚本 洋子

[NAME OR APPELLATION]

Tsukamoto Yoko

【住所又は居所】

神奈川県横浜市神奈川区羽沢町
1150番地 旭硝子株式会社中
央研究所内

[ADDRESS or DOMICILE]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

笹部 哲生

Sasabe Tetsuo

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

大阪府羽曳野市はびきの3-7-
1 大阪府立羽曳野病院内

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

岸田 健一

Kishida Kenichi

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

大阪府羽曳野市はびきの3-7-
30 大阪府立看護大学内

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

田野 保雄

Tano Yasuo

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

兵庫県神戸市東灘区鴨子ヶ原3
-13-25

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 切通 彰

[NAME OR APPELLATION]

Kiritooshi Akira

【住所又は居所】

[ADDRESS or DOMICILE]

大阪府大阪市中央区石町1-1
-11-1305

(74)【代理人】

(74)[AGENT]

【弁理士】

[PATENT ATTORNEY]

【氏名又は名称】

泉名 謙治

[NAME OR APPELLATION]

Spring name Kenji

(57)【要約】**(57)[ABSTRACT of the Disclosure]****【課題】**

緑内障の治療に有用な薬剤を提供する。

[SUBJECT of the Invention]

Chemicals useful for glaucomatous treatment are provided.

【解決手段】

アルギニン－グリシン－アスパラギン酸またはアルギニン－サルコシン－アスパラギン酸なるアミノ酸配列を含むペプチドを有効成分とする緑内障治療薬。

[PROBLEM to be solved]

Glaucoma therapeutic agent which contains as an active ingredient peptide including amino acid sequence which is arginine-glycine-aspartic acid or arginine-sarcosine-aspartic acid.

【特許請求の範囲】**[CLAIMS]****【請求項1】**

アルギニン－グリシン－アスパラギン酸またはアルギニン－サルコシン－アスパラギン酸なるアミノ酸配列を含むペプチド、またはそのペプチドの薬学的に許容できる塩、を有効成分とする緑内障治療薬。

[CLAIM 1]

Glaucoma therapeutic agent which contains as an active ingredient peptide including amino acid sequence which is arginine-glycine-aspartic acid or arginine-sarcosine-aspartic acid or pharmacologically acceptable salt of the peptide, and these.

【請求項2】

ペプチドが、アミノ酸残基数20以下のペプチドである、請求項1の緑内障治療薬。

[CLAIM 2]

Glaucoma therapeutic agent of Claim 1 whose peptide is with a number of amino acid residues 20 or less peptide.

【請求項3】

ペプチドが、N末端とC末端とが

[CLAIM 3]

Glaucoma therapeutic agent of Claim. 1 or 2

ペプチド結合により環状化されている環状ペプチドである、請求項1または2の緑内障治療薬。

whose peptide is cyclic peptide with which N terminal and C terminal are made cyclic by peptide bond.

【請求項4】

環状
 [-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-]
 からなるアミノ酸配列を有する環状ペプチドを有効成分とする緑内障治療薬。

[CLAIM 4]

Glaucoma therapeutic agent which contains as an active ingredient cyclic peptide which has amino acid sequence which is made of cyclic [-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-].

【請求項5】

徐放性担持体に担持された請求項1、2、3または4のペプチドまたはその塩からなる緑内障治療薬。

[CLAIM 5]

Glaucoma therapeutic agent which is made of peptide or its salt of Claim 1, 2, 3 or 4 which sustained-release carrier carried.

【発明の詳細な説明】

[DETAILED DESCRIPTION of the INVENTION]

[0001]**[0001]****【発明の属する技術分野】**

本発明は、特定のペプチドまたはその薬学的に許容できる塩を有効成分とする緑内障治療薬に関する。

[TECHNICAL FIELD of the Invention]

This invention relates to glaucoma therapeutic agent which contains specific peptide or its pharmacologically acceptable salt as an active ingredient.

[0002]**[0002]****【従来の技術】**

アルギニン-グリシン-アスパラギン酸なるアミノ酸配列(以下RGD配列という)を含むペプチド(以下RGDペプチドという)は、細胞の細胞外基質への接着に関与す

[PRIOR ART]

Peptide (henceforth RGD peptide) including amino acid sequence (henceforth RGD sequence) which is arginine-glycine-aspartic acid is found out as a peptide which is involved in attachment to extra-cellular substrate of cell,

るペプチドとして見いだされ、試験管内評価において種々の生理活性が見いだされてきた。RGDペプチドの癌転移阻害効果や血小板凝集阻害効果などについては、すでに報告され、癌転移阻害剤または抗血栓剤としての有効性が認められている。また、骨粗鬆症の治療薬の可能性についても報告されている。しかし、RGD配列を含む蛋白質の存在は広く生体内で知られており、さらに多くの薬効が想定される。

[0003]

一方、RGDペプチドの生理活性は比較的分子量のペプチドであるが故に体内での不安定性、早い体内クリアランスなどから問題点が多数あった。これらの問題を解決するために、線状ペプチドの両末端をペプチド結合によって環状化することによって活性の向上、体内での安定性を高めることが証明されている(特開平2-174797号公報参照)。また、このRGD配列におけるグリシン残基の代わりにサルコシン(すなわち、N-メチルグリシン)残基が存在するアルギニン-サルコシン-アスパラギン酸なるアミノ酸配列を含むRGDペプチド類縁体は、RGDペプチドと同様の生理活性を有することが知られている。さらに本発明者らによってこのRGDペプチド類縁体を上記のように環状化

various biological activity has been found out in evaluation in test tube.

Cancer-metastasis inhibitory effect, platelet-aggregation inhibitory effect, etc. of RGD peptide are already reported, effectiveness as cancer-metastasis inhibitor or an antithrombotic is observed.

Moreover, the possibility of therapeutic agent of osteoporosis is also reported.

However, presence of protein including RGD sequence is known widely in the living body, much more drug activities are assumed.

[0003]

On the other hand, the biological activity of RGD peptide is peptide of low molecular weight comparatively, instability in inside of the body. There were many problems, such as early clearance in the living body.

In order to solve these problems, by making both terminal of linear peptide cyclic by peptide bond, activity improves and it is proved that stability in inside of the body increases (refer to Unexamined-Japanese-Patent No. 2-174797).

Moreover, it is known that RGD peptide related substance including amino acid sequence which is arginine-sarcosine-aspartic acid in which sarcosine (that is, N-methylglycine) residue exists instead of glycine residue in this RGD sequence has biological activity similar to RGD peptide.

By furthermore making this RGD peptide related substance cyclic as mentioned above by present inventors, activity improves like RGD peptide and it is proved that stability in inside of

することによってRGDペプチドと同様に活性の向上、体内での安定性を高めることが証明されている(特開平4-264097号公報参照)。さらには、このような環状ペプチドや他の手段で(たとえばジスルフィド結合で)環状化した環状ペプチドも知られている(特表平3-501610号公報や特表平5-508860号公報参照)。以下、このRGDペプチド類縁体もRGDペプチドという。

[0004]

ペプチド結合により環状化された環状ペプチドの合成には液相合成法その他、オキシム樹脂法(W.F.DeGrado,E.T.Kaiser;J.Org.Chem.,45,1295-1300,1980)を用いた固相合成法による環状ペプチドの合成が知られている。また、本発明者らによっても固相合成法の改良法が提案されている(本出願人の出願にかかわる特開平5-25196号公報参照)。

[0005]

このような環状ペプチド合成方法が開発されたことにより、多数の環状ペプチドが短期間に合成されるようになり、高活性あるいは高い特異性を持つ新たなRGDペプチドの発見が導かれるとともに、新しい生理活性についての評価が可能となった。

the body increases (refer to Unexamined-Japanese-Patent No. 4-264097). Furthermore, such a cyclic peptide and cyclic peptide made cyclic with other means (by for example, disulfide bond) are also known (Patent Publication 3-501610,5-508860 refer). Hereafter, this RGD peptide related substance is also called RGD peptide.

[0004]

Synthesis of cyclic peptide by solid-phase synthesis method which used oxime resin method (W. F.DeGrado, E.T.Kaiser;J.Org.Chem., 45, 1295- 1300, 1980) besides liquid-phase synthesis method for synthesis of cyclic peptide made cyclic by peptide bond is known. Moreover, method of improving solid-phase synthesis method is proposed by present inventors (refer to Unexamined-Japanese-Patent No. 5-25196 in connection with application of this applicant).

[0005]

Many cyclic peptides come to be compounded by having developed such cyclic peptide synthesis method for a short period of time, while discovery of new RGD peptide with high activity or high specificity was drawn, evaluation about new biological activity is completed.

[0006]

【発明が解決しようとする課題】

本発明者は、RGDペプチドを眼科疾患の処置剤としての有効性について検討した。上記特表平5-508860号公報には、眼球炎症疾患の治療剤としての環状RGDペプチドの用途が示唆されている。しかしながら、どのような眼球炎症疾患にどのように有効であるかは記載されていない。本発明者はRGDペプチドについて緑内障治療薬としての有効性について検討した。

[0006]

[PROBLEM to be solved by the Invention]

This inventor examined RGD peptide about effectiveness as a provision agent of ophthalmologic disease.

Application of cyclic RGD peptide as a therapeutic agent of eyeball inflammation illness is suggested to above-mentioned Patent Publication 5-508860.

However, it is not described how it is effective in what kind of eyeball inflammation illness.

This inventor examined effectiveness as glaucoma therapeutic agent about RGD peptide.

[0007]

緑内障に関しては、緑内障手術である線維柱体切除術は、切除した線維柱体部を通して眼内の房水を結膜下に誘導し、濾過胞の形成により眼圧を調節することを意図とする手術である。しかし、時間の経過とともに結膜の繊維芽細胞が濾過胞部に移動・増殖し房水の通路が閉鎖され、濾過胞が消失して再び眼圧が上昇することが多く見られる。従って、緑内障濾過手術の成否は、術後の濾過胞の維持にかかっているといえる。現在、繊維芽細胞の増殖を抑制してこの濾過法を維持するために、5-フルオロウラシルやマイトマイシンC等の抗癌剤が投与されているが、強膜壊死を始め副作

[0007]

It is operation which considers as intent that fibrous column excision which is glaucoma operation derives aqueous humor of intraocular under conjunctiva through excised fibrous column section, and adjusts intraocular pressure according to formation of filtrationskissen about glaucoma.

However, it often happens that fibrocyte of conjunctiva moves * propagates with passage of time at filtrationskissen section, passage of aqueous humor is closed, filtrationskissen loses, and intraocular pressure raises again.

Therefore, it can be said that success or failure of glaucoma filtering operation start maintenance of postoperative filtrationskissen.

In order to suppress propagation of fibrocyte and to maintain this filtration process now, it administers carinostatic, such as 5-fluorouracil

用が強く問題が多い。そこで、抗癌剤にかわる新しいタイプの新薬が強く期待されている。

and Mitomycin C.

However, sclera necrosis is begun, side reaction is strong and there are many problems. Then, new medicine new type substituting for carinostatic is anticipated strongly.

[0008]

[0008]

【課題を解決するための手段】

[MEANS to solve the Problem]

本発明者らはこのような状況に鑑み、RGDペプチドについて試験管内評価を行ったところ、ヒト結膜繊維芽細胞や網膜芽細胞腫の接着に対して阻害効果があることがわかった。さらに主鎖が環状であるRGDペプチドでは細胞接着に対する阻害効果が増強され、かつ持続性が高まることを見いだした。本発明はこのような知見に基づく下記発明である。

When present inventors took into consideration in such a situation and evaluation in test tube was performed about RGD peptide, it found that there is inhibitory effect to attachment of human conjunctiva fibrocyte or retinoblastoma.

In RGD peptide principal chain is still more cyclic, inhibitory effect with respect to cell adhesion is enhanced, and it found out that persistence increased.

This invention is the following invention based on such findings.

[0009]

[0009]

アルギニン-グリシン-アスパラギン酸またはアルギニン-サルコシン-アスパラギン酸なるアミノ酸配列を含むペプチド、またはそのペプチドの薬学的に許容できる塩、を有効成分とする緑内障治療薬。

Peptide including amino acid sequence which is arginine-glycine-aspartic acid or arginine-sarcosine-aspartic acid, or pharmacologically acceptable salt of the peptide, glaucoma therapeutic agent which contains these as an active ingredient.

[0010]

[0010]

【発明の実施の形態】

[EMBODIMENT of the Invention]

アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(Arg-Gly-Asp)なるアミノ酸配列を含むペプチドおよびアルギニン-サルコシン-アスパラ

Peptide including amino acid sequence which is peptide and arginine-sarcosine-aspartic acid (Arg-Sar-Asp) including amino acid sequence which is arginine-glycine-aspartic acid

ギン酸(Arg-Sar-Asp) なるアミノ酸配列を含むペプチドは前記RGDペプチドである。本発明のペプチドは通常の線状構造を有するペプチドであってもよい。しかし前記した理由により、より好ましくは環状のペプチドである。

(Arg-Gly-Asp) is said RGD peptide. Peptide which has usual linear structure is sufficient as peptide of this invention. However, above-mentioned reason, it is peptide cyclic more preferably.

[0011]

本発明におけるペプチドのアミノ酸残基数は、特に限定されないが、20以下、特に10以下が好ましい。アミノ酸残基数のより多いペプチドではRGD等の有効な配列部分が立体障害などで隠されて十分な効果が発揮されないおそれがある。ただし、(Arg-Gly-Asp) や(Arg-Sar-Asp) なる配列を含む比較的短いアミノ酸配列(たとえば、アミノ酸残基数5以下の配列)の2以上の繰り返しからなるペプチドはこの限りではない。しかし、合成の容易さや安定性からはこの場合であってもアミノ酸残基数は上記のように短いことが好ましい。

[0011]

The number of amino acid residues in particular of peptide in this invention is not limited.

However

20 or less

In particular, ten or less are desirable.

In more peptides of the number of amino acid residues, there is a risk that effective sequence part of RGD etc. may be hidden by steric hindrance etc., and sufficient effect may not be demonstrated.

However (Arg-Gly-Asp), peptide which it is (Arg-Sar-Asp) is made of two or more repeating of comparatively short amino acid sequence (with a number of amino acid residues for example, five or less sequence) including sequence, it is not limited to this.

However, even if it is this case from composite easy shell stability, as mentioned above short thing of the number of amino acid residues is desirable.

[0012]

環状化されたRGDペプチドとして、2つのシステイン残基のメルカプト基同士をジスルフィド結合で結合して環状化した環状のRGD

[0012]

Cyclic RGD peptide which connected and made mercapto groups of two cystein residues cyclic by disulfide bond as a RGD peptide made cyclic is known.

ペプチドが知られている。本発明における環状のペプチドはこのような環状のペプチドであってもよい。しかし、ジスルフィド結合はペプチド結合に比較して安定性が低いことより、本発明においてより好ましい環状のペプチドは、下記ペプチド結合により環状化されている環状のペプチドである。

[0013]

本発明におけるペプチドとして好ましい環状のペプチドは、ペプチド結合により環状化されている環状のペプチドである。ペプチド結合は α 位のアミノ基と α 位のカルボキシル基が縮合して生成するペプチド結合のみからなることが好ましい。すなわち、線状ペプチドの両末端(すなわち、N末端とC末端)の α 位のアミノ基と α 位のカルボキシル基が縮合した構造を有する環状のペプチドが好ましい。このような環状のペプチドは末端基(α 位のアミノ基や α 位のカルボキシル基)が存在しないことにより、安定性がきわめて高いという特徴を有する(前記環状ペプチドにかかわる公知例参照)。

[0014]

しかし、場合によっては、本発明におけるペプチドは側鎖のアミノ基やカルボキシル基がペプチド結合することにより生成する環状のペプチドであってもよい。このよ

Such a cyclic peptide is sufficient as cyclic peptide in this invention.

However, cyclic peptide in this invention more preferable than stability of disulfide bond is low compared with peptide bond is cyclic peptide made cyclic by the following peptide bond.

[0013]

Cyclic peptide desirable as a peptide in this invention is cyclic peptide made cyclic by peptide bond.

As for peptide bond, it is desirable that it is made only of peptide bond which amino group of alpha position and carboxyl group of alpha position condense and generate.

That is, cyclic peptide which has structure which amino group of alpha position of both terminal (that is, N terminal and C terminal) of linear peptide and carboxyl group of alpha position condensed is desirable.

Such a cyclic peptide has characteristics of being very extremely stable, when terminal group (amino group of alpha position and carboxyl group of alpha position) does not exist (refer to well-known example in connection with said cyclic peptide).

[0014]

However, cyclic peptide generated when amino group and carboxyl group of side chain peptide-bond depending on case is sufficient as peptide in this invention.

As for such a cyclic peptide, it is usually that

うな環状のペプチドは α 位のアミノ基または α 位のカルボキシル基が末端基として残存することが通例であり、安定性の面で上記末端基のない環状のペプチドよりも劣ることが少なくない。

[0015]

なお、上記の環状のペプチドの説明は合成法を限定するためのものではない。たとえば環状化はアミノ酸配列の任意のアミノ酸残基間で行うことができる。たとえば、RGD配列のRとGの間でペプチド結合を生成して環状化を行うことができる。

[0016]

本発明におけるペプチドとしては公知のものであってもよい。環状のペプチドとしては、たとえば、前記特開平2-174797号公報や特開平4-264097号公報に記載されている環状のペプチドが好ましい。特に好ましい環状のペプチドは、このような線状ペプチドのN末端の α 位のアミノ基とC末端の α 位のカルボキシル基が縮合した構造を有する環状のペプチドであり、以下このようなタイプの環状のペプチドを単に環状ペプチドという。具体的な環状ペプチドとして特に好ましいものは環状[-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-]からなるアミノ酸配列を有する環

amino group of alpha position or carboxyl group of alpha position remains as a terminal group. It is not rare to be inferior to cyclic peptide which does not have the above-mentioned terminal group in respect of stability.

[0015]

In addition, it is not for explanation of the above-mentioned cyclic peptide limiting synthesis method.

For example, cyclic-ization can be performed among desired amino acid residues of amino acid sequence.

For example, peptide bond can be generated between R and G of RGD sequence, and cyclic-ization can be performed.

[0016]

As a peptide in this invention, it may be well-known.

As a cyclic peptide, said cyclic peptide described by Unexamined-Japanese-Patent No. 2-174797,4-264097 is desirable, for example.

Especially preferable cyclic peptide is cyclic peptide which has structure which amino group of alpha position of N terminal of such a linear peptide and carboxyl group of alpha position of C terminal condensed.

Cyclic, such type peptide is only called cyclic peptide below.

Thing especially preferable as a concrete cyclic peptide is a cyclic peptide which has amino acid sequence which is made of cyclic [-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-].

状ペプチドである。

[0017]

本発明におけるペプチドは側鎖にカルボキシル基を有し、またアミノ基などの塩基性基を有する場合もあることより、このペプチドの塩を形成させることができる。本発明においてこのペプチドの薬学的に許容できる塩もまた緑内障治療薬として有用である。塩としては、たとえば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アンモニウム塩、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、こはく酸塩などがある。

[0017]

Peptide in this invention has carboxyl group in side chain; moreover, also when it has basic groups, such as amino group, salt of this peptide can be formed from a certain thing.

Pharmacologically acceptable salt of this peptide is also in this invention useful as glaucoma therapeutic agent.

As a salt, there are sodium salt, potassium salt, calcium salt, ammonium salt, hydrochloride, sulfate, phosphate, succinic-acid salt, etc., for example.

[0018]

本発明におけるペプチド(またはその塩)の投与量としては、特に限定されないが、1眼1日あたり0.001~100mg、特に0.01~10mgが適当である。

[0018]

It is not limited in particular as a dosage of peptide (or its salt) in this invention.

However, it is 0.001 - 100 mg per day 1 eyes, 0.01 - 10 mg is suitable in particular.

[0019]

本発明のペプチド(またはその塩)は製剤化して局所(すなわち眼)に投与されることが好ましい。しかしこれに限定されるものではなく注射などによる眼以外の部分への投与や経口投与もできる。製剤は通常の眼科用液状製剤は勿論、懸濁液状製剤、軟膏状製剤、固体担持製剤などであってもよい。特に有効成分を徐放することができる徐放性担持体に担持されて使用されることが好ましい。徐

[0019]

As for peptide (or its salt) of this invention, it is desirable that formulate and part (that is, eye) administers.

However, administration and oral administration into parts other than eye by not thing but injection etc. limited to this can also be performed.

Suspension-like formulation, salve-like formulation, solid carrying formulation, etc. may be used for formulation as well as usual ophthalmic liquid formulation.

It is desirable to be used for it by

放性担持体としては、通常の眼科用徐放性担持体、たとえばエチレン-酢酸ビニル共重合体などを素材とした徐放性担持体が使用できる。

sustained-release carrier which can release slowly in particular active ingredient, carrying.

As a sustained-release carrier, sustained-release carrier made from the usual ophthalmic sustained-release carrier, for example, ethylene- vinyl-acetate- polymer etc., etc. can be used.

[0020]

以下、本発明を実施例によって具体的に説明するが、本発明はこの実施例に限られるものではない。

[0020]

Hereafter, Example specifically demonstrates this invention.

However, this invention is not restricted to this Example.

[0021]

なお、実施例に用いた環状 [-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-] からなるアミノ酸配列を有する環状ペプチド(以下 c-GRGDSPA という)は、特開平2-174797号公報記載の実施例1に従って合成したものを用いた。また、Arg-Gly-Asp-Ser からなるアミノ酸配列を有する線状ペプチド(以下 RGDS という)、および Arg-Gly-Asp-Trp からなるアミノ酸配列を有する線状ペプチド(以下 RGDW という)は、公知の方法で合成したものを用いた。

[0021]

In addition, what is compounded according to Example 1 of Unexamined-Japanese-Patent No. 2-174797 is used for cyclic peptide (henceforth c-GRGDSPA) which has amino acid sequence which is made of cyclic [-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-] used for Example.

Moreover, what is compounded by well-known method is used for linear peptide (it is called Following RGDS) which has amino acid sequence which is made of Arg-Gly-Asp-Ser, and linear peptide (it is called Following RGDW) which has amino acid sequence which is made of Arg-Gly-Asp-Trp.

[0022]**【実施例】**

[例1:RGDペプチドによる細胞接着阻害効果]ヒト結膜繊維芽細胞、ヒト網膜芽腫細胞、ウサギ水

[0022]**[EXAMPLES]**

Example 1: cell-adhesion inhibitory effect by RGD peptide

Human conjunctiva fibrocyte, human

晶体上皮細胞をそれぞれRGDペプチドと共に培養し、経時的に24時間後まで接着細胞数を計測した。その結果を表1～6に示す。表1～6に培養時間とペプチド濃度における細胞の接着抑制率(%)を示す。表に示すように特にC-GRGDSPAは各種細胞に対して接着阻害活性を持ち、培養開始後24時間後もその効果を保っていた。

[0023]

また、網膜芽腫細胞を培養開始5日後、RGDペプチドを含む培養液に交換し、その後の培養細胞の形態的变化を経時的に観察した。ペプチドを添加する前の細胞は培養皿に接着し、神経細胞用の突起を出していたが、添加1時間後にはその突起の先が鈍化し、6時間後には、ほとんどの突起は目立たなくなった。さらに、細胞は球形になり、集塊を作って浮遊した。RGDペプチドは網膜芽腫細胞の接着に対して明らかに阻害的に働いていることが確認された。

[0024]**[表1]**

retinoblastoma cell, and rabbit epithelium-of-lens cell are cultured with RGD peptide, respectively, the number of adherent cell was measured until after 24 hours with time. The result is shown to Table 1- 6.

Attachment suppression percentage (%) of cell in culture time and peptide concentration is shown to Table 1- 6.

C-GRGDSPA had attachment inhibitory activity to various cell in particular as shown in table, and 24 hours after after culture start maintained the effect.

[0023]

Moreover, retinoblastoma cell is exchanged for culture medium containing RGD peptide five days after culture start, morphological change of subsequent cultured cell was observed with time.

Cell before adding peptide is attached on culture dish, projection for neurocyte was issued.

However, 1 hour after addition, point of the projection becomes slow, almost all projections stopped being conspicuous 6 hours after.

Furthermore, cell becomes globular form, agglomerate lump was made and floated.

It is checked that RGD peptide works clearly in obstruction to attachment of retinoblastoma cell.

[0024]**[TABLE 1]**

抑制率 [ペプチド: c-GRGDSPA、細胞: ヒト結膜繊維芽細胞]					
培養時間(hr)	0	1	3	6	24
濃度(mg/ml)					
2		0±0	27.3±9.1	55.8±24.1	86.3±7.5
1		0±0	8.7±7.8	35.7±3.3	49.8±8.4
0.5		0±0	1.4±1.5	4.6±3.3	10.5±12.2
0.25		0±0	0±0	0±0	13.4±13.7
0.125		0±0	0±0	0±0	14.6±6.6
0	0±0	0±0	3.2±3.2	0±0	1.0±1.7

Suppression rate [Peptide: ..., Cell: Human conjunctiva fibrocyte]

Culture time

Concentration

【0025】

【0025】

【表2】

[TABLE 2]

抑制率 [ペプチド: RGDS、細胞: ヒト結膜繊維芽細胞]					
培養時間(hr)	0	1	3	6	24
濃度(mg/ml)					
2		0±0	0±0	25.1±13.8	69.4±20.4
1		0±0	0±0	4.4±3.0	6.2±5.5
0.5		0±0	0±0	0±0	3.7±4.3
0.25		0±0	0±0	0±0	0±0
0.125		0±0	0±0	0±0	0±0
0	0±0	0±0	3.2±3.2	0±0	1.0±1.7

Suppression rate [Peptide: ..., Cell: Human conjunctiva fibrocyte]

Culture time

Concentration

【0026】

[0026]

【表3】

[TABLE 3]

抑制率 [ペプチド: c-GRGDSPA、細胞: ヒト網膜芽腫細胞]				
培養時間(hr)	0	1	3	24
濃度(mg/ml)				
0.1		3.5±1.0	100±0	100±0
0.05		0±0	100±0	100±0
0.025		0±0	29.2±17.0	63.3±17.0
0.0125		0±0	0.9±1.2	2.1±2.9
0	3.7±5.3	3.5±2.5	3.8±0.8	0±0

Suppression rate [Peptide: ..., Cell: Human retinoblastoma cell]

Culture time

Concentration

【0027】

[0027]

【表4】

[TABLE 4]

抑制率 [ペプチド:RGDS、細胞:ヒト網膜芽腫細胞]				
培養時間(hr)	0	1	3	24
濃度(mg/ml)				
0.1		4.3±2.2	99.2±2.0	9.3±9.4
0.05		0±0	75.9±9.1	4.4±4.5
0.025		0±0	9.6±3.0	0±0
0.0125		0±0	3.5±3.0	0±0
0	3.7±5.3	3.5±2.5	3.8±0.8	0±0

Suppression rate [Peptide: ..., Cell: Human retinoblastoma cell]

Culture time

Concentration

[0028]

[0028]

[表5]

[TABLE 5]

抑制率 [ペプチド:c-GRGDSPA、細胞:ウサギ水晶体上皮細胞]				
培養時間(hr)	0	1	3	24
濃度(mg/ml)				
0.1		91.7±12.8	100±0	100±0
0.05		81.4±14.1	100±0	100±0
0.025		27.8±7.1	100±0	100±0
0.0125		16.2±10.7	54.2±15.5	96.5±4.1
0	3.7±5.3	3.9±2.5	6.6±2.3	5.4±3.6

Suppression rate [Peptide: ..., Cell: Rabbit epithelium-lentis cell]

Culture time

Concentration

[0029]

[0029]

[表6]

[TABLE 6]

抑制率 [ペプチド:RGDS、細胞:ウサギ水晶体上皮細胞]				
培養時間(hr)	0	1	3	24
濃度(mg/ml)				
0.1		62.1±13.2	100±0	69.2±12.3
0.05		31.6±10.0	100±0	45.5±11.3
0.025		8.1±3.6	24.2±9.8	5.9±2.7
0.0125		9.4±5.9	5.3±3.6	0±0
0	3.7±5.3	3.9±2.5	6.6±2.3	5.4±3.6

Suppression rate [Peptide: ..., Cell: Rabbit epithelium-lentis cell]

Culture time

Concentration

[0030]

[0030]

[例2:RGDペプチドによる細胞接着阻害効果] 接着した細胞を剥がす効果について検討するため、フィブロネクチンとコラーゲンタイプIV(以下Col 4という)をそれぞれコートしたプレート上でウサギ水晶体上皮株細胞(以下TOTL-86という)、ヒト水晶体上皮細胞(以下HEL-17という)および網膜芽細胞腫株細胞(以下WERI-mという)を24時間培養後

Example 2: cell-adhesion inhibitory effect by RGD peptide

In order to examine effect of stripping attached cell, RGD peptide was added for rabbit epithelium-of-lens stock cell (henceforth TOTL-86), human epithelium-of-lens cell (henceforth HEL-17), and retinoblastoma stock cell (henceforth WERI-m) after cultivating for 24 hours on plate which carried out coat of the collagen type IV (it is called following Col4) to fibronectin, respectively, and the total number of



RGDペプチドを添加し3時間後、総接着細胞数を計測した。その結果を表7～8に示す。表7はフィブロネクチンコートプレートを用いて上記3種の細胞を培養した場合の細胞接着抑制率(%)を示す表であり、表8は Col 4 コートプレートを用いて TOTL-86 を培養した場合の細胞接着抑制率(%)を示す表である。

[0031]

表7～8に示されるように、フィブロネクチンコートプレートにおいてRGDペプチド50 μ g/mlを添加することにより、TOTL-86 およびHEL-17 の接着を95%以上、WERI-m の接着を85%以上抑制していた。また、Col 4 コートプレート上ではTOTL-86 の接着を1 mg/mlで100%抑制し、250 μ g/mlで66%抑制した。

[0032]**[表7]**

adherent cell was measured 3 hours after.

The result is shown to Table 7- 8.

Table 7 is table which shows cell-adhesion suppression percentage (%) at the time of culturing cell of said 3 topic using fibronectin coat plate.

Table 8 is table which shows cell-adhesion suppression percentage (%) at the time of cultivating TOTL-86 using four quart plate of Col(s).

[0031]

As Table 7- 8 showed, 85 % or more of attachment of 95 % or more and WERI-m was suppressed for attachment of TOTL-86 and HEL-17 by adding RGD peptide 50 microgram/ml in fibronectin coat plate.

Moreover, on four quart plate of Col(s), attachment of TOTL-86 is suppressed 100% by 1 mg/ml, it suppressed 66% by 250 microgram(s)/ml.

[0032]**[TABLE 7]**

ペプチド の種類	ペプチド の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞の種類		
		TOTL-86	HEL-17	WERI-m
c-GRGDSPA	200	100 %	98.7 %	100 %
	100	99.7 %	100 %	100 %
	50	97.8 %	95.0 %	86.0 %
RGDS	500	93.2 %	76.1 %	79.2 %
	250	73.0 %	57.2 %	41.7 %
	125	27.2 %	28.3 %	13.2 %
RGDW	500	82.8 %	67.9 %	61.8 %
	250	42.9 %	26.4 %	59.2 %
	125	28.8 %	10.7 %	9.7 %

Kind of peptide; Concentration of peptide; Kind of cell

【0033】

[0033]

【表8】

[TABLE 8]

ペプチド の種類	ペプチド の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞の種類
		TOTL-86
c-GRGDSPA	1000	96.3 %
	500	79.3 %
	250	65.5 %
	125	23.2 %
RGDS	2500	26.0 %
	1250	20.4 %
	675	-6.7 %
	340	-8.2 %
RGDW	2500	28.5 %
	1250	16.7 %
	675	0.8 %
	340	-2.0 %

Kind of peptide; Concentration of peptide; Kind of cell

【0034】

[例3: 緑内障術後の繊維芽細胞増殖に対するRGDペプチドの効果] 緑内障手術は濾過手術であり、術後結膜繊維芽細胞の増殖により、効果がなくなることが多い。そこで細胞接着阻害活性をもつRGDペプチドによる効果を検討するため、有色家兎眼に線維柱帯切除術を施行し、片方の眼に0.2mlのRGDS(5mg/ml)またはc-GRGDSPA(1mg/ml)を結膜下注射し、他眼に同量の溶媒のみを投与した。術後の眼

【0034】

Example 3: effect of RGD peptide with respect to fibrocyte propagation after glaucoma operation

Glaucoma operation is filtering operation.

By propagation of postoperative conjunctiva fibrocyte, effect is lost in many cases.

Then, in order to examine effect by RGD peptide with cell-adhesion inhibitory activity, trabeculectomy is enforced to colored domestic rabbit eye, one side's eye is injected with 0.2 ml RGDS (5 mg/ml) or c-GRGDSPA (1 mg/ml) under conjunctiva, only same amount solvent was administered to other eyes.

圧を空気眼圧計にて測定し、濾過胞の状態を顕微鏡下で観察した。その結果、対照眼では平均5日で濾過胞が消失したのに対し、RGDS 投与群では平均13日、c-GRGDSPA 投与群では平均15日まで有意に濾過胞の存在期間が延長した。眼圧は、対照眼では平均10日で眼圧の上昇が見られたのに対し、RGDS、c-GRGDSPA 投与群では眼圧上昇までの期間が延長し、平均21日に眼圧の上昇が認められた。

【0035】

【発明の効果】

実施例に示すように、RGDペプチドは緑内障の治療に有効であり、特に環状のRGDペプチドは顕著な効果を示す。

Postoperative intraocular pressure is measured in air tonometer, state of filtrationskissen was observed under microscope.

As a result, in control eye, filtrationskissen's presence period extended significantly on average by RGDS administration group to filtrationskissen having lost in an average of five days till the 13th (c-GRGDSPA administration group an average of 15 days).

By RGDS and c-GRGDSPA administration group, period to increase of intraocular pressure extends intraocular pressure to raise of intraocular pressure being seen by control eye in an average of ten days, raise of intraocular pressure is observed on an average of the 21st.

【0035】

[ADVANTAGE of the Invention]

RGD peptide is effective in glaucomatous treatment as shown in Example.

In particular cyclic RGD peptide shows remarkable effect.



DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-17488

(43) 公開日 平成10年(1998) 1月20日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	ABL		A 6 1 K 37/02	ABL
	AED		C 0 7 K 5/08	ZNA
// C 0 7 K 5/08	ZNA		7/64	
7/64			14/78	
14/78			A 6 1 K 37/02	AED
			審査請求 未請求 請求項の数 5	OL (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平8-164849

(22) 出願日 平成8年(1996) 6月25日

(71) 出願人 000000044

旭硝子株式会社

東京都千代田区丸の内2丁目1番2号

(72) 発明者 塚本 洋子

神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地

旭硝子株式会社中央研究所内

(72) 発明者 笹部 哲生

大阪府羽曳野市はびきの3-7-1 大阪

府立羽曳野病院内

(72) 発明者 岸田 健一

大阪府羽曳野市はびきの3-7-30 大阪

府立看護大学内

(74) 代理人 弁理士 泉名 謙治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 緑内障治療薬

(57) 【要約】

【課題】 緑内障の治療に有用な薬剤を提供する。

【解決手段】 アルギニン-グリシン-アスパラギン酸またはアルギニン-サルコシン-アスパラギン酸なるアミノ酸配列を含むペプチドを有効成分とする緑内障治療薬。

【特許請求の範囲】

【請求項1】アルギニン-グリシン-アスパラギン酸またはアルギニン-サルコシン-アスパラギン酸なるアミノ酸配列を含むペプチド、またはそのペプチドの薬学的に許容できる塩、を有効成分とする緑内障治療薬。

【請求項2】ペプチドが、アミノ酸残基数20以下のペプチドである、請求項1の緑内障治療薬。

【請求項3】ペプチドが、N末端とC末端とがペプチド結合により環状化されている環状ペプチドである、請求項1または2の緑内障治療薬。

【請求項4】環状[-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-]からなるアミノ酸配列を有する環状ペプチドを有効成分とする緑内障治療薬。

【請求項5】除放性担持体に担持された請求項1、2、3または4のペプチドまたはその塩からなる緑内障治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、特定のペプチドまたはその薬学的に許容できる塩を有効成分とする緑内障治療薬に関する。

【0002】

【従来の技術】アルギニン-グリシン-アスパラギン酸なるアミノ酸配列（以下RGD配列という）を含むペプチド（以下RGDペプチドという）は、細胞の細胞外基質への接着に関与するペプチドとして見いだされ、試験管内評価において種々の生理活性が見いだされてきた。RGDペプチドの癌転移阻害効果や血小板凝集阻害効果などについては、すでに報告され、癌転移阻害剤または抗血栓剤としての有効性が認められている。また、骨粗鬆症の治療薬の可能性についても報告されている。しかし、RGD配列を含む蛋白質の存在は広く生体内で知られており、さらに多くの薬効が想定される。

【0003】一方、RGDペプチドの生理活性は比較的低分子量のペプチドであるが故に体内での不安定性、早い体内クリアランスなどから問題点が多数あった。これらの問題を解決するために、線状ペプチドの両末端をペプチド結合によって環状化することによって活性の向上、体内での安定性を高めることが証明されている（特開平2-174797号公報参照）。また、このRGD配列におけるグリシン残基の代わりにサルコシン（すなわち、N-メチルグリシン）残基が存在するアルギニン-サルコシン-アスパラギン酸なるアミノ酸配列を含むRGDペプチド類縁体は、RGDペプチドと同様の生理活性を有することが知られている。さらに本発明者らによってこのRGDペプチド類縁体を上記のように環状化することによってRGDペプチドと同様に活性の向上、体内での安定性を高めることが証明されている（特開平4-264097号公報参照）。さらには、このような環状ペプチドや他の手段で（たとえばジスルフィド結合

で）環状化した環状ペプチドも知られている（特表平3-501610号公報や特表平5-508860号公報参照）。以下、このRGDペプチド類縁体もRGDペプチドという。

【0004】ペプチド結合により環状化された環状ペプチドの合成には液相合成法その他、オキシム樹脂法(W.F. DeGrado, E. T. Kaiser; J. Org. Chem., 45, 1295-1300, 1980)を用いた固相合成法による環状ペプチドの合成が知られている。また、本発明者らによっても固相合成法の改良法が提案されている（本出願人の出願にかかわる特開平5-25196号公報参照）。

【0005】このような環状ペプチド合成方法が開発されたことにより、多数の環状ペプチドが短期間に合成されるようになり、高活性あるいは高い特異性を持つ新たなRGDペプチドの発見が導かれるとともに、新しい生理活性についての評価が可能となった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は、RGDペプチドを眼科疾患の処置剤としての有効性について検討した。上記特表平5-508860号公報には、眼球炎症疾患の治療剤としての環状RGDペプチドの用途が示唆されている。しかしながら、どのような眼球炎症疾患にどのように有効であるかは記載されていない。本発明者はRGDペプチドについて緑内障治療薬としての有効性について検討した。

【0007】緑内障に関しては、緑内障手術である線維柱体切除術は、切除した線維柱体部を通して眼内の房水を結膜下に誘導し、濾過胞の形成により眼圧を調節することを意図する手術である。しかし、時間の経過とともに結膜の繊維芽細胞が濾過胞部に移動・増殖し房水の通路が閉鎖され、濾過胞が消失して再び眼圧が上昇することが多く見られる。従って、緑内障濾過手術の成否は、術後の濾過胞の維持にかかっているといえる。現在、繊維芽細胞の増殖を抑制してこの濾過法を維持するために、5-フルオロウラシルやマイトマイシンC等の抗癌剤が投与されているが、強膜壊死を始め副作用が強く問題が多い。そこで、抗癌剤にかわる新しいタイプの新薬が強く期待されている。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らはこのような状況に鑑み、RGDペプチドについて試験管内評価を行ったところ、ヒト結膜繊維芽細胞や網膜芽細胞腫の接着に対して阻害効果があることがわかった。さらに主鎖が環状であるRGDペプチドでは細胞接着に対する阻害効果が増強され、かつ持続性が高まることを見いだした。本発明はこのような知見に基づく下記発明である。

【0009】アルギニン-グリシン-アスパラギン酸またはアルギニン-サルコシン-アスパラギン酸なるアミノ酸配列を含むペプチド、またはそのペプチドの薬学的に許容できる塩、を有効成分とする緑内障治療薬。

【0010】

【発明の実施の形態】アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(Arg-Gly-Asp)なるアミノ酸配列を含むペプチドおよびアルギニン-サルコシン-アスパラギン酸(Arg-Sar-Asp)なるアミノ酸配列を含むペプチドは前記RGDペプチドである。本発明のペプチドは通常の線状構造を有するペプチドであってもよい。しかし前記した理由により、より好ましくは環状のペプチドである。

【0011】本発明におけるペプチドのアミノ酸残基数は、特に限定されないが、20以下、特に10以下が好ましい。アミノ酸残基数の多いペプチドではRGD等の有効な配列部分が立体障害などで隠されて充分な効果が発揮されないおそれがある。ただし、(Arg-Gly-Asp)や(Arg-Sar-Asp)なる配列を含む比較的短いアミノ酸配列(たとえば、アミノ酸残基数5以下の配列)の2以上の繰り返しからなるペプチドはこの限りではない。しかし、合成の容易さや安定性からはこの場合であってもアミノ酸残基数は上記のように短いことが好ましい。

【0012】環状化されたRGDペプチドとして、2つのシステイン残基のメルカプト基同士をジスルフィド結合で結合して環状化した環状のRGDペプチドが知られている。本発明における環状のペプチドはこのような環状のペプチドであってもよい。しかし、ジスルフィド結合はペプチド結合に比較して安定性が低いことより、本発明においてより好ましい環状のペプチドは、下記ペプチド結合により環状化されている環状のペプチドである。

【0013】本発明におけるペプチドとして好ましい環状のペプチドは、ペプチド結合により環状化されている環状のペプチドである。ペプチド結合は α 位のアミノ基と α 位のカルボキシル基が縮合して生成するペプチド結合のみからなることが好ましい。すなわち、線状ペプチドの両末端(すなわち、N末端とC末端)の α 位のアミノ基と α 位のカルボキシル基が縮合した構造を有する環状のペプチドが好ましい。このような環状のペプチドは末端基(α 位のアミノ基や α 位のカルボキシル基)が存在しないことにより、安定性がきわめて高いという特徴を有する(前記環状ペプチドにかかわる公知例参照)。

【0014】しかし、場合によっては、本発明におけるペプチドは側鎖のアミノ基やカルボキシル基がペプチド結合することにより生成する環状のペプチドであってもよい。このような環状のペプチドは α 位のアミノ基または α 位のカルボキシル基が末端基として残存することが通例であり、安定性の面で上記末端基のない環状のペプチドよりも劣ることが少なくない。

【0015】なお、上記の環状のペプチドの説明は合成法を限定するためのものではない。たとえば環状化はアミノ酸配列の任意のアミノ酸残基間で行うことができる。たとえば、RGD配列のRとGの間でペプチド結合を生成して環状化を行うことができる。

【0016】本発明におけるペプチドとしては公知のものであってもよい。環状ペプチドとしては、たとえば、前記特開平2-174797号公報や特開平4-264097号公報に記載されている環状のペプチドが好ましい。特に好ましい環状のペプチドは、このような線状ペプチドのN末端の α 位のアミノ基とC末端の α 位のカルボキシル基が縮合した構造を有する環状のペプチドであり、以下このようなタイプの環状のペプチドを単に環状ペプチドという。具体的な環状ペプチドとして特に好ましいものは環状[-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-]からなるアミノ酸配列を有する環状ペプチドである。

【0017】本発明におけるペプチドは側鎖にカルボキシル基を有し、またアミノ基などの塩基性基を有する場合もあることより、このペプチドの塩を形成させることができる。本発明においてこのペプチドの薬学的に許容できる塩もまた緑内障治療薬として有用である。塩としては、たとえば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アンモニウム塩、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、これは酸塩などがある。

【0018】本発明におけるペプチド(またはその塩)の投与量としては、特に限定されないが、1眼1日あたり0.001~100mg、特に0.01~10mgが適当である。

【0019】本発明のペプチド(またはその塩)は製剤化して局所(すなわち眼)に投与されることが好ましい。しかしこれに限定されるものではなく注射などによる眼以外の部分への投与や経口投与もできる。製剤は通常の眼科用液状製剤は勿論、懸濁液状製剤、軟膏状製剤、固体担持製剤などであってもよい。特に有効成分を徐放することができる徐放性担持体に担持されて使用されることが好ましい。徐放性担持体としては、通常の眼科用徐放性担持体、たとえばエチレン-酢酸ビニル共重合体などを素材とした徐放性担持体が使用できる。

【0020】以下、本発明を実施例によって具体的に説明するが、本発明はこの実施例に限られるものではない。

【0021】なお、実施例に用いた環状[-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-]からなるアミノ酸配列を有する環状ペプチド(以下c-GRGDSPAという)は、特開平2-174797号公報記載の実施例1に従って合成したものをを用いた。また、Arg-Gly-Asp-Serからなるアミノ酸配列を有する線状ペプチド(以下RGDSという)、およびArg-Gly-Asp-Trpからなるアミノ酸配列を有する線状ペプチド(以下RGDWという)は、公知の方法で合成したものをを用いた。

【0022】

【実施例】

【例1: RGDペプチドによる細胞接着阻害効果】ヒト結膜繊維芽細胞、ヒト網膜芽腫細胞、ウサギ水晶体上皮細胞をそれぞれRGDペプチドと共に培養し、経時的に

5

6

24時間後まで接着細胞数を計測した。その結果を表1～6に示す。表1～6に培養時間とペプチド濃度における細胞の接着抑制率(%)を示す。表に示すように特にc-GRGDSPAは各種細胞に対して接着阻害活性を持ち、培養開始後24時間後もその効果を保っていた。

【0023】また、網膜芽腫細胞を培養開始5日後、RGDペプチドを含む培養液に交換し、その後の培養細胞の形態的变化を経時的に観察した。ペプチドを添加する*

*前の細胞は培養皿に接着し、神経細胞用の突起を出していたが、添加1時間後にはその突起の数が減少し、6時間後には、ほとんどの突起は目立たなくなった。さらに、細胞は球形になり、集塊を作って浮遊した。RGDペプチドは網膜芽腫細胞の接着に対して明らかに阻害的に働いていることが確認された。

【0024】

【表1】

抑制率【ペプチド:c-GRGDSPA、細胞:ヒト結膜線維芽細胞】					
培養時間(hr)	0	1	3	6	24
濃度(mg/ml)					
2		0±0	27.3±9.1	55.8±24.1	86.3±7.5
1		0±0	8.7±7.8	35.7±3.3	49.8±8.4
0.5		0±0	1.4±1.5	4.6±3.3	10.5±12.2
0.25		0±0	0±0	0±0	13.4±13.7
0.125		0±0	0±0	0±0	14.6±6.6
0	0±0	0±0	3.2±3.2	0±0	1.0±1.7

【0025】

※ ※【表2】

抑制率【ペプチド:RGDS、細胞:ヒト結膜線維芽細胞】					
培養時間(hr)	0	1	3	6	24
濃度(mg/ml)					
2		0±0	0±0	25.1±13.8	69.4±20.4
1		0±0	0±0	4.4±3.0	6.2±5.5
0.5		0±0	0±0	0±0	3.7±4.3
0.25		0±0	0±0	0±0	0±0
0.125		0±0	0±0	0±0	0±0
0	0±0	0±0	3.2±3.2	0±0	1.0±1.7

【0026】

★ ★【表3】

抑制率【ペプチド:c-GRGDSPA、細胞:ヒト網膜芽腫細胞】				
培養時間(hr)	0	1	3	24
濃度(mg/ml)				
0.1		3.5±1.0	100±0	100±0
0.05		0±0	100±0	100±0
0.025		0±0	29.2±17.0	63.3±17.0
0.0125		0±0	0.9±1.2	2.1±2.9
0	3.7±5.3	3.5±2.5	3.8±0.8	0±0

【0027】

☆ ☆【表4】

抑制率 [ペプチド:RGDS、細胞:ヒト膀胱癌細胞]				
培養時間(hr)	0	1	3	24
濃度(mg/ml)				
0.1		4.3±2.2	99.2±2.0	9.3±9.4
0.05		0±0	75.9±9.1	4.4±4.5
0.025		0±0	9.6±3.0	0±0
0.0125		0±0	3.5±3.0	0±0
0	3.7±5.3	3.5±2.5	3.8±0.8	0±0

【0028】

* * 【表5】

抑制率 [ペプチド:c-GRGDSPA、細胞:ウサギ水晶体上皮細胞]				
培養時間(hr)	0	1	3	24
濃度(mg/ml)				
0.1		91.7±12.8	100±0	100±0
0.05		81.4±14.1	100±0	100±0
0.025		27.8±7.1	100±0	100±0
0.0125		16.2±10.7	54.2±15.5	96.5±4.1
0	3.7±5.3	3.9±2.5	6.6±2.3	5.4±3.6

【0029】

* * 【表6】

抑制率 [ペプチド:RGDS、細胞:ウサギ水晶体上皮細胞]				
培養時間(hr)	0	1	3	24
濃度(mg/ml)				
0.1		62.1±13.2	100±0	69.2±12.3
0.05		31.6±10.0	100±0	45.5±11.3
0.025		8.1±3.6	24.2±9.8	5.9±2.7
0.0125		9.4±5.9	5.3±3.6	0±0
0	3.7±5.3	3.9±2.5	6.6±2.3	5.4±3.6

【0030】【例2:RGDペプチドによる細胞接着抑制効果】接着した細胞を剥がす効果について検討するため、フィブロネクチンとコラーゲン タイプIV (以下Co14という)をそれぞれコートしたプレート上でウサギ水晶体上皮細胞(以下TOTAL-86という)、ヒト水晶体上皮細胞(以下HEL-17という)および網膜芽細胞腫細胞(以下WERI-1という)を24時間培養後RGDペプチドを添加し3時間後、総接着細胞数を計測した。その結果を表7～8に示す。表7はフィブロネクチンコートプレートを用いて上記3種の細胞を培養した場合の細胞接着抑制率(%)を示す表であり、表8はCo14コート★

★レートを用いてTOTAL-86を培養した場合の細胞接着抑制率(%)を示す表である。

【0031】表7～8に示されるように、フィブロネクチンコートプレートにおいてRGDペプチド50μg/mlを添加することにより、TOTAL-86およびHEL-17の接着を95%以上、WERI-1の接着を85%以上抑制していた。また、Co14コートプレート上ではTOTAL-86の接着を1mg/mlで100%抑制し、250μg/mlで66%抑制した。

【0032】

【表7】

ペプチド の種類	ペプチド の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞の抑制		
		TOTL-86	HEL-17	VERI-m
c-GRGDSPA	200	100 %	98.7 %	100 %
	100	99.7 %	100 %	100 %
	50	97.8 %	95.0 %	86.0 %
RGDS	500	93.2 %	76.1 %	79.2 %
	250	73.0 %	57.2 %	41.7 %
	125	27.2 %	28.3 %	13.2 %
RGDW	500	82.8 %	67.9 %	61.8 %
	250	42.9 %	26.4 %	59.2 %
	125	28.8 %	10.7 %	9.7 %

【0033】

【表8】

ペプチド の種類	ペプチド の濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞の種類
		TOTL-86
c-GRGDSPA	1000	96.3 %
	500	79.3 %
	250	65.5 %
	125	23.2 %
RGDS	2500	26.0 %
	1250	20.4 %
	675	-6.7 %
	340	-8.2 %
RGDW	2500	28.5 %
	1250	16.7 %
	675	0.8 %
	340	-2.0 %

*するRGDペプチドの効果】緑内障手術は濾過手術であり、術後結膜繊維芽細胞の増殖により、効果がなくなることが多い。そこで細胞接着阻害活性をもつRGDペプチドによる効果を検討するため、有色家兎眼に線維柱帯切除術を施行し、片方の眼に0.2mlのRGDS(5mg/ml)またはc-GRGDSPA(1mg/ml)を結膜下注射し、他眼に同量の溶媒のみを投与した。術後の眼圧を空気眼圧計にて測定し、濾過胞の状態を顕微鏡下で観察した。その結果、対照眼では平均5日で濾過胞が消失したのに対し、RGDS投与群では平均13日、c-GRGDSPA投与群では平均15日まで有意に濾過胞の存在期間が延長した。眼圧は、対照眼では平均10日で眼圧の上昇が見られたのに対し、RGDS、c-GRGDSPA投与群では眼圧上昇までの期間が延長し、平均21日に眼圧の上昇が認められた。

【0035】

【発明の効果】実施例に示すように、RGDペプチドは緑内障の治療に有効であり、特に環状のRGDペプチドは顕著な効果を示す。

【0034】【例3：緑内障術後の繊維芽細胞増殖に対* 40

フロントページの続き

(72)発明者 田野 保雄

兵庫県神戸市東灘区鴨子ヶ原3-13-25

(72)発明者 切通 彰

大阪府大阪市中央区石町1-1-11-1305

BEST AVAILABLE COPY

DERWENT-ACC-NO: 1998-140931

DERWENT-ABER: 199813

\~4~COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD\~14~

TITLE: Glaucoma preventing composition - contains peptide containing amino acid sequence of arginine-glycine-aspartic acid or arginine-sarcosine-aspartic acid

INVENTOR-NAME:

PRIORITY-DATA: 1996JP-0164849 (June 25, 1996)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO

PUB-DATE

LANGUAGE

PAGES

MAIN-IPC

JP 10017488 A

January 20, 1998

N/A

006

A61K 038/00

INT-CL (IPC): A61K038/00; C07K005/08 ; C07K007/64 ; C07K014/78

ABSTRACTED-PUB-NO: JP10017488A

BASIC-ABSTRACT: Glaucoma preventing composition contains peptide containing amino acid sequence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD) or arginine-sarcosine-aspartic acid or their salts.

The peptide preferably has at most 20 amino acid residues. The peptide is cyclised through N-terminal and C-terminal by peptide linkage. The cyclic peptide comprises an amino acid sequence of cyclic [-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-]. The peptide or its salt is carried on a carrier for controlled release.

ADVANTAGE - The agent, RGD peptide especially cyclic RGD, has preventing effect for glaucoma by the inhibitory activity to intercellular adhesion e.g. human conjunctiva fibroblast and human retinoblastoma.

ABTX:

Glaucoma preventing composition contains peptide containing amino acid sequence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD) or arginine-sarcosine-aspartic acid or their salts.

ABTX:

ADVANTAGE - The agent, RGD peptide especially cyclic RGD, has preventing effect

BEST AVAILABLE COPY

for glaucoma by the inhibitory activity to intercellular adhesion
e.g. human
conjunctiva fibroblast and human retinoblastoma.